Lane Medical Library

[AUS DEM HYGIENISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT BERLIN.]
LEITER: PROF. C. FLÜGGE.

DIE PRÜFUNG DER ZUR SCHUTZIMPFUNG GEGEN CHOLERA HERGESTELLTEN IMPFSTOFFE.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG

DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

AN DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

VON

HEINZ SOLTMANN
AUS OBER-SCHREIBERHAU.

TAG DER PROMOTION: 29. JUNI 1915.

LEIPZIG,
VEIT & COMP.
1915.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Berlin.

Dekan: Geh. Ober-Med.-Rat Prof. Dr. Waldeyer.
Referent: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Flügge.

Vorliegende Arbeit erscheint in der
„Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten“. Bd. LXXX.

Druck von Metzger & Wittig in Leipzig.

DEM ANDENKEN MEINES VATERS
UND MEINER LIEBEN MUTTER

GEWIDMET.

Im Laufe der letzten Jahre sind eine große Reihe von Impfverfahren gegen Cholera und Typhus empfohlen worden, die sich im wesentlichen durch die Herstellungsart der verwendeten Impfstoffe voneinander unterscheiden.

Der erste, der auf Grund von Versuchen an Meerschweinchen Schutzimpfungen an Menschen ausführte, war der spanische Arzt Ferran, der im Jahre 1884 bei der damals in Spanien herrschenden Choleraepidemie gegen 25000 Personen vaccinierte. Er ging in der Weise vor, daß er zunächst 8 Tropfen einer lebenden Cholerakultur subkutan injizierte; nach 6 bis 8 Tagen eine zweite Injektion von 0·5 ccm, nach abermals 8 Tagen eine dritte von der gleichen Menge. Ferran wurde von seinen Zeitgenossen heftig angefeindet. Zweifellos konnte man ihm vorhalten, weder mit Reinkulturen gearbeitet noch für eine wissenschaftliche Begründung seiner Methode und einwandsfreie Impfstatistik gesorgt zu haben. Es ist aber sein unbestrittenes Verdienst, als erster die Immunisierungsmöglichkeit beim Menschen erwiesen zu haben.

Nach ihm wandte Haffkine[1] ebenfalls lebende Kulturen an und führte damit bis zum Jahre 1895 in Indien Impfungen in sehr großem

[1] Vgl. Friedberger, Typhus- und Cholera-Schutzimpfungen, in Kraus-Levaditis *Handbuch.* 1908. Bd. I.

Umfange, an etwa 40000 Menschen, aus. Er benutzte nach dem Vorgange Pasteurs zwei Vaccins, ein durch lange fortgesetzte Züchtung bei hohen Temperaturen abgeschwächtes Vaccin 1 und ein Vaccin 2 mit vollvirulenten Vibrionen, während Powel und Brown[1] nach glücklich verlaufenen Selbstversuchen sogleich mit Vaccin 2 an einer größeren Anzahl von Personen Impfungen vorgenommen haben.

Die genannten Autoren berichten über günstige Resultate, vermochten aber keine lückenlos beweiskräftige Statistik zu erbringen. Ebensowenig findet sich bei ihnen irgend ein Nachweis von spezifischen Schutzstoffen bei den Impflingen. Endlich konnte ihre Methode schon wegen der Gefahr der Ausbreitung der Cholera durch die Verwendung lebender Kulturen keine Anhänger finden. Dieser Übelstand veranlaßte Tamancheff schon 1896, Versuche mit einem mittels Karbolsäure abgetöteten Vaccin anzustellen, der an Menschen geringere Reaktionen hervorrief als der Haffkinesche, ein Verfahren, auf das neuerdings Kisskalt[2] für den Typhusimpfstoff wieder zurückgekommen ist.

Inzwischen brachten die Arbeiten R. Pfeiffers und seiner Schüler über das Choleragift und die Choleraimmunität höchst bedeutsame Fortschritte. Insbesondere gelang Kolle der Nachweis, daß der Immunisierungserfolg mit toten Bakterien der gleiche war wie mit lebenden.

Seitdem wurde eine große Reihe von Impfstoffen aus abgetöteten Erregern empfohlen. Die Abtötung kann mit den verschiedensten Agentien, u. a. mit chemischen Mitteln, durch Autolyse und durch Hitze, erfolgen. Die gebräuchlichste Methode ist gegenwärtig die Erhitzung nach dem Vorgange Kolles. Seine Vorschrift zur Herstellung des Cholera-Vaccins lautet: Eine 24 Stunden alte Agarröhrchen-Cholerakultur (= 20 mg) wird mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, so daß 1 ccm 2 mg Kulturmasse enthält. Die Abschwemmung wird alsdann 1 Stunde auf 58° erhitzt und mit 5prozentigem Phenol versetzt, so daß der fertige Vaccin 0·5 Prozent Phenol enthält. Die Impfung besteht in 2 Injektionen, zuerst von 1 ccm, nach Ablauf von 5 Tagen die doppelte Dosis. — Typhus-Vaccin enthält nur $^1/_3$ so viel Kulturmasse wie Cholera-Vaccin, d. h. $^2/_3$ mg pro Kubikzentimeter und wird nicht auf 58°, sondern auf 54° $1^1/_2$ Stunden erhitzt.

Das Kollesche[3] Verfahren wurde zuerst mit günstigem Erfolge von Murata praktisch erprobt, als im Jahre 1902 im japanischen Regierungsbezirk Hiogo eine Choleraepidemie ausbrach. Ebenso wurde es in Ruß-

[1] Vgl. Friedberger, a. a. O.

[2] Kisskalt: Eine Modifikation des Typhusimpfstoffes. *Deutsche med. Wochenschrift* 1915. Nr. 14. S. 393.

[3] Kolle-Wassermann, *Handbuch.* 1913. Bd. II. S. 42 u. 44.

land während der Epidemien der letzten Jahre angewandt. Für Typhus sind in den Jahren 1904 bis 1907 im südwestafrikanischen Aufstandsgebiet an deutschen Truppen größere Erfahrungen gesammelt worden. Die Zahl der Erkrankten und Todesfälle war erheblich geringer bei den Geimpften bei einwandfrei vergleichbarer Gesamtzahl.

Unterdessen wurden unabhängig von Kolle unter der Führung Wrights an englischen Truppen in Indien, Ägypten und Südafrika zahlreiche Erfahrungen gesammelt. Der Impfstoff Wrights[1] unterscheidet sich durch die Verwendung flüssiger Nährböden (Bouillon) zur Züchtung. Leishman und Harrison[2] haben später zur Verbesserung unvirulente Kulturen und Abtötung bei niedrigeren Temperaturen oder nur durch 24stündiges Einwirken von 0·25prozentigem Lysol, sowie geringe Menge der Dosis vorgeschlagen, um die Nebenwirkungen, wie Fieber, Störung des Allgemeinbefindens, möglichst herabzudrücken.

Weiterhin wurde noch eine große Reihe von Modifikationen der Impfstoffherstellung teils für Typhus teils für Cholera vorgeschlagen. Sie kommen aber praktisch bisher nicht in Betracht, da sie weder genügend am Menschen erprobt sind, noch im Vergleich zu der Schwierigkeit ihrer Herstellung genügend Vorteile bieten. Es wird daher in der Regel gegenwärtig das Verfahren von Pfeiffer und Kolle benutzt, das sich auf exakte Untersuchungen stützt durch den Nachweis spezifischer Immunstoffe mittels der von Pfeiffer ausgearbeiteten Methode der Bestimmung des bakteriziden Titers.

Die Vorschriften für die Herstellung der Impfstoffe nach diesem Verfahren lauten gewöhnlich ungefähr folgendermaßen:

„Agarkulturen verwenden. Abschwemmen in physiologischer Kochsalzlösung.

Dosierung: bei Typhus $^1/_3$ Öse pro Kubikzentimeter.
„ Cholera 2 Ösen „ „

Abtöten bei 54° bzw. 58° 1 Stunde. Sterilitätskontrollen anlegen. Soviel Karbol zusetzen, daß der gebrauchsfertige Impfstoff höchstens $^1/_2$ Prozent Karbol enthält. Den steril befundenen Impfstoff in Flaschen von 20 bis 100 ccm abfüllen.“

Allein diese Vorschriften bilden nur die Grundlinien des Verfahrens und lassen noch zahlreiche Abweichungen bei der Herstellung zu.

Soll ein Impfstoff zuverlässig sein, so sind mindestens noch folgende Kautelen zu beachten:

---

[1] Zitiert bei Kolle-Wassermann, *Handbuch.* 1913. Bd. II. S. 46.
[2] *Ebenda.* 1913. Bd. II. S. 49.

1. Der Stamm muß zu Immunisierungszwecken geeignet sein.

2. Die Abtötung der lebenden Kultur muß sicher, aber schonend vor sich gehen.

3. Jede einzelne Abfüllung muß auf Sterilität geprüft werden.

4. Die Impfstoffe müssen stets die gleiche Konzentration zeigen, so daß eine einheitliche Dosierung möglich ist.

Was den ersten Punkt anbelangt, so achte man darauf, daß der zum Vaccin verwendete Stamm morphologisch und biologisch die charakteristischen Merkmale aufweist. Die Cholerabazillen müssen deutliche Vibrionenform haben und im hängenden Tropfen lebhaft beweglich sein. In biologischer Beziehung wird man ein charakteristisches Wachstum auf spezifischen Nährböden fordern. Bei Cholera erwarten wir eine starke Vermehrung in Peptonwasser und die charakteristischen, glasigen Kolonien auf Choleragar und Blutagar nach Dieudonné oder Esch. Den feinsten Indikator für die Spezifität haben wir in der Agglutinationsprobe und im Pfeifferschen Versuch. Schließlich wird die Auswahl des Stammes auch davon abhängen, ob die Kulturen im Tierversuch zur Bildung genügender, spezifischer Immunstoffe befähigt sind. Die Vermutung Haffkines, daß besonders virulente Stämme zur Impfstoffbereitung besonders geeignet seien, konnten Pfeiffer und Friedberger experimentell bestätigen.

Zweitens: Zur möglichst schonenden und sicheren Abtötung muß die Höhe und Dauer der Hitzeeinwirkung innerhalb sehr enger Grenzen gehalten werden. Es empfiehlt sich, eine rasche Vorwärmung im Wasserbade bis auf die gewünschte Maximaltemperatur und dann Aufbewahrung in dem auf diese Temperatur eingestellten Brütschrank während der vorgeschriebenen Zeit vorzunehmen.

Drittens: Von besonderer Bedeutung ist ferner die Sterilitätsprobe. Dieselbe soll Gewähr dafür bieten, daß weder Verunreinigungen durch Luftkeime während der Herstellung des Impfstoffs vorkommen, noch überlebende Keime in ihm vorhanden sind. Zweckmäßig nimmt man sie auf verschiedenen und jedenfalls auch auf flüssigen Nährböden vor.

Während diese unter 1 bis 3 aufgeführten Kautelen wohl jetzt in allen Laboratorien genügend berücksichtigt werden, bietet die Erfüllung der vierten Forderung noch gewisse Schwierigkeiten. Ein einheitliches Verfahren zur Herstellung des Impfstoffes gibt es vorläufig nicht. Dementsprechend werden die Impfstoffe mehr oder weniger voneinander in ihrer Konzentration abweichen.

Um so wichtiger ist es dann, zuverlässige Methoden zur Prüfung

der Dichte der nach verschiedener Methode hergestellten Impfstoffe an der Hand zu haben.

Eine Vergleichung der Mittel, welche für diese Prüfung in Betracht kommen, ist der Gegenstand der nachstehend mitgeteilten Versuche.

Prüfung auf gleichmäßige Konzentration der Impfstoffe.

Wie erwähnt, fordern die üblichen Vorschriften zur Herstellung von Cholera-Impfstoff 2 Ösen pro Kubikzentimeter, geben aber keine Anweisung zur Erzielung dieser Konzentration.

Meistens begnügt man sich mit einer Schätzung der benutzten Kulturfläche, so zwar, daß ein Schrägagarröhrchen zu 10 Ösen, eine Petrischale zu 66, eine Kolleschale zu 200 Ösen gerechnet, und demgemäß die Aufschwemmung hergestellt wird. — Andere Laboratorien halten diese Berechnung für zu unsicher, wägen jedesmal die erhaltene Kulturmasse ab und verdünnen diese so, daß auf je 2^{mg} (= 1 Öse) 1^{cc} Kochsalzlösung zugefügt wird.

Bei dieser Verschiedenheit der Bereitung wird es von Interesse sein, festzustellen, ob die nach beiden Methoden hergestellten Impfstoffe die gleiche Konzentration zeigen, und ob bei den nach gleicher Methode bereiteten Abfüllungen stets die erforderliche Gleichmäßigkeit bewahrt wird.

Um diese für die Dosierung der Impfstoffe in der Praxis sehr wichtige Frage zu entscheiden, müssen wir vor allem über Verfahren verfügen, welche den Grad der Konzentration, d. h. die Anzahl wirksamer Keime in der Maßeinheit, zu ermitteln gestatten.

An solchen Verfahren stehen uns zu Gebote:

1. Die Zählung der Bakterien mittels der Zeiss-Thomaschen Zählkammer.
2. Die Auszählung der Bakterien nach Wright.
3. Die Zählung der lebenden Bakterien durch das Plattenverfahren.
4. Die Bestimmung der Transparenz des fertigen Impfstoffes nach Mohrmann.

Diese Verfahren habe ich zunächst untereinander verglichen und für jedes die Fehlerquellen festzulegen versucht. Demnächst habe ich sie zur Prüfung eines Teils von Impfstoffen, die unter Schätzung der Kulturfläche hergestellt waren, und zweitens von Impfstoffen, denen eine Wägung der Kulturmasse zugrunde lag, benutzt.

1. Zählung der Keime mittels der Thoma-Zeiss'schen Zählkammer.

Die Thoma-Zeiss'sche Zählkammer wurde zuerst von Hüppe und Lafar zur Zählung der Bakterien empfohlen. Ihre Brauchbarkeit ist später von Winterberg[1] mit derjenigen der Plattenmethode verglichen. Seit einigen Jahren benutzen sie Reiter[2] und Murrey[3] zur Keimzählung von Bakterien in Vaccinen mit guten Resultaten. Auch Rubner[4] bediente sich ihrer zur Auszählung von Hefezellen.

Winterberg erzielte bei seinen Untersuchungen 1·8 bis 13·6 Prozent Fehler gegen + 14·3 bis 12·5 Prozent in günstigen Fällen, die Neisser[5] bei der Plattenmethode nachgewiesen hat. Es ist aber darauf hinzuweisen, daß Winterberg bei der Prozentangabe das Mittel aus allen Abweichungen zog. Ferner kam er bei seinen Untersuchungen zu dem Resultat, daß die Kammerzählung stets höhere Werte lieferte, als die Zählung von Kolonien bei der Plattenmethode, da ja bei ersteren alle Keime, tote und lebende, berücksichtigt werden, bei letzterer aber im günstigsten Falle nur alle voll entwicklungsfähigen Keime.

Da nach Pfeiffer alle Keime, auch die toten, antikörperauslösend wirken, und somit die letzteren als Bestandteile des Vaccins die gleiche Rolle spielen wie die lebensfähigen, so interessiert uns im vorliegenden Fall gerade die Feststellung aller Keime.

Ihre Zahl in den Impfstoffen ist so erheblich, daß die kleine Probemenge des Impfstoffes vor der Füllung der Kammer mit 10 Teilen physiol. Kochsalzlösung verdünnt werden muß, am besten mit einer Wright'schen Pipette, deren Herstellung bei Reiter[6] beschrieben ist. Nach der Füllung schiebt man, wie bei der Blutkörperchenzählung von der Seite her ein Deckglas über die Kammer, das vollkommen luftdicht anschließen muß, und durchmustert die Kammer in ihrer ganzen Tiefe durch Heben und Senken des Tubus. Man verwendet zweckmäßig als Objektiv die starke Trockenvergrößerung Zeiss, Apert. 0·65 und Okular 8 oder 12. Die Berechnung der Keimzahl erfolgt analog der bei der Blutkörperchenzählung nach der Formel:

$$x = \frac{m \,.\, n \,.\, 4000 \,.\, 1000}{q},$$

[1] *Zeitschrift für Hygiene u. Infektionskrankheiten.* 1898. Bd. XXIX.
[2] H. Reiter, *Vaccinetherapie und -Diagnostik.* 1913. S. 102.
[3] *Lancet.* 1908. I. S. 790.
[4] *Archiv für Hygiene.* 1904. Bd. IL. S. 363.
[5] *Zeitschrift für Hygiene u. Infektionskrankheiten.* Bd. XX.
[6] H. Reiter, a. a. O.

wobei m die Summe der gezählten Bakterien,
n „ Zahl der Verdünnung der Bakteriensuspension
q „ „ „ gezählten Quadrate und
x „ „ „ Bakterien in 1 ccm bedeutet.

Es wurden stets 10 Quadrate gezählt.

Winterberg[1] erwähnt, daß auch die Kammerzählung nicht beanspruchen dürfe, eine quantitative Methode zu sein. Auch sie gäbe im allgemeinen zu geringe Werte, da die Bakterien selbst bei der sorgfältigsten Mischung nur selten sämtlich völlig isoliert seien.

Andererseits entstehen Bedenken, ob nicht ein Teil der Bakterien autolysiert oder durch ungenügende Beleuchtung dem Auge stets verloren geht. Die Schwierigkeit des Erkennens und quantitativen Ermittelns kleinster Objekte, wie der Bakterien, stellt erhebliche Anforderungen an das Auge und kann Fehler in sich bergen. In welchem Grade dies der Fall ist, muß durch kontrollierende wiederholte Untersuchung der gleichen Probe durch denselben und durch mehrere Beobachter ermittelt werden. Die erhaltenen Resultate s. unten in Tab. I u. II.

2. Die Wright'sche Zählmethode.[2]

Sie besteht darin, daß man ein gleiches Volumen Blut mit dem gleichen Volumen Bakterienemulsion des Impfstoffes durchmischt. Dann muß die Zahl der roten Blutkörperchen zur Zahl der Bakterien des Gemisches in demselben Verhältnis stehen, wie die Anzahl der roten Blutkörperchen und Bakterien in der Volumeneinheit (1 ccm).

Man stellt sich also in einem Blockschälchen mittels der erwähnten Wright'schen Pipette eine Mischung her von 1 Vol. Blut (durch Fingerstich), 1 Vol. Bakterienemulsion (Impfstoff) und 3 Vol. Kochsalz (zur Verdünnung), so daß man stets 5 Vol. hat. Zwischen jedem Volumen wird als Index eine Luftblase eingeschaltet. Die Flüssigkeiten werden nun zur guten Durchmischung, wie das auch bei der Kammerzählung zu geschehen hat, mehrmals in die Pipette aufgesogen und wieder ausgestoßen. Dann wird ein mikroskopisches Präparat angefertigt wie bei Blutausstrich und mit Ölimmersion gezählt. Die Fixierung kann mit Methylalkohol, Formalin, Sublimat erfolgen; die Färbung mit Karbolthionin, Fuchsin usw. Die Berechnung führt man aus nach der Formel entsprechend den angenommenen Beziehungen der Flüssigkeiten zueinander:

$$\frac{\text{Bl}}{\text{Ba}} = \frac{5000 \text{ Mill.}}{x},$$

[1] *Zeitschrift für Hygiene u. Infektionskrankheiten.* Bd. XXIX.

[2] Vgl.: Wright, *A short Treatise on Anti-Typhoid Inoculation.* Westminster, Archibald Constable & Comp. 1904. p. 70. — H. Reiter, *Vaccinetherapie und Diagnostik.* 1913. S. 101. — *Handbuch* von Kolle-Wassermann. 1913. Bd. II. S. 47 u. 48. — *Handbuch* von Kraus-Levaditi. 1908. Bd. I. S. 735.

wobei Bl die Anzahl der gezählten Bl. (in 10 G.-Feldern)
Ba „ „ „ „ Ba.
5000 Mill. „ „ „ rot. Bl. in 1 ccm,
x „ „ „ „ Bakterien in 1 ccm bedeutet.

Es ist zweckmäßig, sich die Zählung durch Einschaltung eines Okularzählkreuzes zu erleichtern.

Die Zählkammermethode und das Wrightsche Verfahren wurden nun gleichzeitig an dem gleichen Material geprüft, wobei ich von Frl. Funk, einer langjährigen Schülerin des stellvertret. Abteilungsvorstehers am Institut, Hrn. Dr. Reiter, freundlichst unterstützt wurde. Um sicher zu sein, nur gut verteiltes Material und unter denselben Bedingungen zu prüfen, kamen die Flaschen zunächst 1 Stunde in den Schüttelapparat. Dann erfolgte die Zählung und zwar wurden von beiden Beobachtern

1. dieselben Flaschen am gleichen Tage und
2. nachher noch mehrmals zu verschiedenen Zeiten ausgezählt.

Ich lasse nun die Tabellen folgen:

Tabelle I.

Vergleichende Bestimmungen der Keimzahl (Mill. pro Kubikzentimeter) mittels:

Kammerzählung. Zählung nach „Wright".

Flasche 1. Chol.-Impfstoff vom 12. I. 15.

Datum d. Zählung	Beob. A	Beob. B	Diff. A-B	Beob. A	Beob. B	Diff. A-B
2. II. 15.	3096	2996	100	7700	12 700	5000
5. II. 15.	2868	2820	48	5100	8600	3500
25. II. 15.	3304	3076	228	3800	4200	400
Mittel:	3089	2964	125	5533	8500	2966
Mittel sämtl. Zählungen:		3026			7016	
			absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
Abweichung d. Max. v. Mittel sämtl. Zählgen:			278	+ 9	5684	+ 81
„ „ Min. „ „ „ „			206	− 6·7	3216	− 46

Flasche 2. Chol.-Impfstoff vom 13. I. 15.

Datum d. Zählung	Beob. A	Beob. B	Diff. A-B	Beob. A	Beob. B	Diff. A-B
29. I. 15.	2980	3468	488	2000	1650	350
1. II. 15.	3212	2996	216	4200	4500	300
25. II. 15.	2968	2992	24	5900	6200	300
Mittel:	3053	3152	243	4033	4117	316
Mittel sämtl. Zählungen:		3103			4075	
			absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
Abweichung d. Max. v. Mittel sämtl. Zählgen:			366	+ 12	2125	+ 52
„ „ Min. „ „ „ „			134	− 4·3	2425	− 59

Kammerzählung. Zählung nach „Wright“.

Flasche 3. Chol.-Impfstoff vom 16. I. 15.

Datum d. Zählung	Beob. A	Beob. B	Diff. A-B	Beob. A	Beob. B	Diff. A-B
2. II. 15.	3068	3156	88	4400	6100	1700
6. II. 15.	3208	3148	60	5000	6500	1500
8. II. 15.	3304	2892	412	3000	2900	100
Mittel:	3193	3065	187	4133	5166	1100
Mittel sämtl. Zählungen:	3129				4649	

	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
Abweichung d. Max. v. Mittel sämtl. Zählgen.:	175	+ 5·6	1851	+ 39·8
„ „ Min. „ „ „ „	237	− 7·5	1749	− 37·6

Flasche 4. Chol.-Impfstoff vom 18. I. 15.

Datum d. Zählung	Beob. A	Beob. B	Diff. A-B	Beob. A	Beob. B	Diff. A-B
29. I. 15.	3554	3576	22	4 000	4 580	580
30. I. 15.	4080	4176	96	7 600	8 900	1300
1. II. 15.	3504	3744	240	30 375	26 182	4193
Mittel:	3713	3832	119	13 992	13 221	2026
Mittel sämtl. Zählungen:	3772				13 606	

	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
Abweichung d. Max. v. Mittel sämtl. Zählgen.:	404	+ 10	16 769	+ 123
„ „ Min. „ „ „ „	268	− 7	9 606	− 70

Flasche 5. Chol.-Impfstoff vom 5. II. 15.

Datum d. Zählung	Beob. A	Beob. B	Diff. A-B	Beob. A	Beob. B	Diff. A-B
27. II. 15.	4088	4096	8	6600	7000	200
16. III. 15.	3944	4204	266	4500	4600	160
Mittel:	4016	4150	134	5550	5800	150
Mittel sämtl. Zählungen:	4083				5675	

	absolut	in Proz.	absolut	in Proz.
Abweichung d. Max. v. Mittel sämtl. Zählgen.:	121	+ 2·7	1325	+ 23
„ „ Min. „ „ „ „	139	− 3·4	1175	− 20·7

Aus diesen Zahlen können wir folgende Schlüsse ziehen:

Die Resultate der „Wrightschen“ Methode sind unbefriedigend. Wir finden weder eine Übereinstimmung der Einzelbeobachtungen untereinander, noch mit der Kammerzählung. Dies beruht hauptsächlich offenbar auf der Schwierigkeit, gleichmäßig verteilte Ausstriche zu erzielen. Um dies aber noch besonders zu beleuchten, machte ich von derselben Flasche (vom 12. I. 15) 6, von einer anderen Flasche (vom 5. II. 15 4 Ausstriche unmittelbar hintereinander.

Ihre Auszählung ergab:

Tabelle II.

	Versuch A		Versuch B	
Ausstrich	Beob. A	Beob. B	Beob. A	Beob. B
Nr. 1	5000	5100	6800	7000
„ 2	4400	4900	5300	5100
„ 3	7100	6800	5100	5000
„ 4	3000	4900	2900	2900
„ 5	4000	5900		
„ 6	3600	4500		
Mittel:	5416	5350	5026	5000
Abweichg. d. Max. vom Mittel:	+ 2584	+ 1450	+ 1774	+ 2000
„ „ Min. „ „ :	— 1516	— 850	— 2120	— 2100
Größte absol. Differenz:	7100 — 3000 = 4100		7000 — 2900 = 4100	

Man wird daher in der Schlußfolgerung kaum fehlgehen, daß die Zählung nach dieser Methode keine brauchbaren Werte liefert. Je nach der Dicke des Ausstriches, der von der Winkelhaltung des Ausstrichglases abhängt, fällt die Verteilung von Bakterien und Blutkörperchen verschieden aus. Welche Haltung aber die richtige Verteilung ergibt, das ist durch keine Vorschrift fixiert und bleibt dem Ermessen des Einzelnen überlassen. Wrights[1] Mitarbeiter, Leishman[1], Harrison, Bulloch und Smalman haben selbst darauf hingewiesen, daß die Methode eine Reihe Fehlerquellen birgt. Sie erwähnen, daß es fast unmöglich sei, eine gleichmäßige Verteilung von Bakterien und Blutzellen über das ganze Präparat zu erhalten, und daß die Zusammenballung durch die Agglutinine des normalen Serums störend wirke. Diese läßt sich zwar beseitigen, gestaltet das Verfahren aber nicht einfacher. Weitere Fehler entstehen bei der Fixierungs- und Färbeprozedur des Ausstriches. Auf diese Übelstände wird auch in den erwähnten Handbüchern[2] und bei Reiter[3] hingewiesen.

Bei der Kammerzählung liegen die Verhältnisse bedeutend günstiger. Wir sehen im Vergleich zu den hohen Zahlen nur geringe Abweichungen der Zählergebnisse von 2 Beobachtern. Auch die Resultate mehrerer Einzelbeobachtungen halten sich in zulässigen Grenzen. Wir haben bei einer Zahl von etwa 3500 Mill. Keimen pro 1 ccm mit einer Fehlerbreite von nur + 12 bis — 7·5 Prozent zu rechnen.

[1] An Investigation upon Blood changes flowing Antityphoidinoculation. *Journal Hygiene.* 1905. Vol. 5. p. 380.

[2] Kolle-Wassermann. 1913. Bd. II. S. 48. Kraus-Levaditi. 1908. Bd. I. S. 736.

[3] Reiter, *Vaccinetherapie und Diagnostik.* 1913. S. 104.

Die Kammerzählung ist danach die entschieden brauchbarere Methode zur Bestimmung der Keimzahl der Impfstoffe und ein gutes Mittel zur Prüfung der gleichmäßigen Konzentration.

3. Die Kolonienzählung durch das Plattenverfahren.

Dies Verfahren ist von größtem Wert und der mikroskopischen Zählung der Individuen unbedingt überlegen, wenn es sich darum handelt, die Zahl der lebenden Keime festzustellen. Wie bereits oben erwähnt wurde, liegt aber diese Aufgabe bei der Beurteilung der Impfstoffe nicht vor, da auch die toten Bakterienleiber für den immunisatorischen Effekt in Betracht kommen. Schon deshalb ist für unsere Zwecke von der Kolonienzählung abzusehen, oder sie ist nur gelegentlich als Ergänzung heranzuziehen. — Es kommt hinzu, daß das Verfahren mehr Zeit und Arbeit erfordert, und daß die Gleichmäßigkeit der Resultate durch kleinste Änderungen der Temperatur, der Zeitdauer der Bebrütung usw. sehr stark beeinflußt wird.

Für eine genau 20stündige Kultur von Cholera fanden Gotschlich und Weigang in 1 Öse:

Cholerakeime in Mill.		
1034	Stamm Pfeiffer 20stünd.	Kultur
2066	„ „	„
576	„ Losca	„
1910	„ Inowrazlaw	„

Danach scheint es, als ob selbst bei peinlichster Einhaltung der gleichen Wachstumsbedingungen die Keimzahl auch von Stammeseigentümlichkeiten erheblich abhängig ist.

Ich habe bei verschiedenen Impfstoffen Parallelbestimmungen mit der Kammerzählung ausgeführt. Für die Plattenzählung benutzte ich entweder eine ausgewogene Öse 20stündiger Kultur à 2 mg. Oder in den meisten Fällen wurde eine durch mehrmalige Wägungen geeichte, 2 mg Kulturmasse fassende Öse zur Verreibung des Materials in 1 ccm benutzt ohne vorheriges Wägen, da Pfeiffer[1] mit Recht Bedenken äußert bezüglich der Fehlerquellen, „die bei den kleinen in Frage kommenden Gewichtsmengen durch die ganz unkontrollierbare Wasserverdunstung während des Verweilens auf der Wage entstehen.“

[1] *Zeitschrift für Hygiene u. Infektionskrankheiten.* Bd. 17. S. 359.

Die Resultate waren folgende:

	Kolonien in Mill. pro Öse	Kammerzählung.
Impfstoff 1	1321	1500
„ 2	1257	1820
„ 3	1883	2250
„ 4	1257	1950
„ 5	1358	2400

Ganz abgesehen von den bedeutenden Schwankungen der Wachstumsintensität, auf die schon Gotschlich und Weigang hingewiesen haben, und auf die ich unten noch zurückkommen werde, sehen wir, daß die Zahlen bei der Plattenmethode stets geringer ausfallen wie bei der Kammerzählung. Dies war nicht anders zu erwarten, schon weil bei letzterem Verfahren die toten Individuen mitgezählt werden; und außerdem gelingt es selbst bei sorgfältigster Mischung sehr schwer, die Einzelindividuen wirklich so zu isolieren, daß jedesmal eine Kolonie einem Individuum entspricht. — Die Differenz zwischen den nach beiden Methoden ermittelten Zahlen ist aber auch keineswegs eine gleichmäßige; und ich muß daher die Plattenmethode für den Zweck der Impfstoffprüfung als ungeeignet ansehen.

Es ist mir unverständlich, wie einige Laboratorien gerade die Plattenzählungen den Angaben über den Keimgehalt der Impfstoffe zugrunde legen können. Leishman[1] hat eine solche Methode angegeben (und die Höchster Farbwerke haben sie nach ihren Prospekten übernommen), die darin besteht, daß man in der Kulturaufschwemmung das Verhältnis der Keimzahl zu dem gewichtsanalytisch zu ermittelnden Trockengewicht der Kultur feststellt. Die Keimzahl wird dabei mit der Plattenmethode ermittelt. Angeblich enthält der Impfstoff der Höchster Farbwerke 5000 Millionen Keime in 1 ccm. Der Wert dürfte infolge der Fehler der zur Prüfung verwendeten Methode erheblich zu hoch sein.

4. Die Transparenzmethode.

Von einfacheren physikalischen Methoden zur Bestimmung des Konzentrationsgrades konnte an die Wägung im Pyknometer gedacht werden. Einige Versuchsproben lieferten aber unbefriedigende Resultate, da die Gewichtsunterschiede der zu vergleichenden Flüssigkeiten Kochsalz und Kochsalz-Bakterienmasse zu gering ausfielen, während die kleinsten Temperaturschwankungen schon sehr bedeutende Ausschläge bewirkten. Dagegen

[1] *Journal of the Royal Army. Med. Corps.* 1897. — Ref. in Kraus-Levaditi, *Handbuch.* 1908. Bd. I. S. 736.

ist eine Methode praktisch sehr wohl in Betracht zu ziehen, die Auswertung durch Bestimmung der Transparenz.

Zuerst hat Wright in Gemeinschaft mit Leishman eine optische Methode der Impfstoff-Bestimmung ausgearbeitet, nachdem ihn die starken individuellen Schwankungen der Meerschweinchen gegenüber dem Typhusgift von der Auswertung der Impfdosis am Tier abgebracht hatten. Die Methode ist beschrieben bei Kraus-Levaditi.[1]

Sie besteht im wesentlichen darin, daß man das Bild eines Objektträgers mit hellen und dunklen Linien im Planspiegel eines Mikroskopes durch den völlig linsenlosen Tubus unter Einschaltung des Impfstoffes betrachtet. Es gilt nun die minimalste Schicht des Vaccins ausfindig zu machen, bei dem eben das Liniensystem verschwindet. Wright hebt selbst hervor, daß autolytische Vorgänge die Durchsichtigkeit des Impfstoffes in unkontrollierbarer Weise verändern können, und hat daher die Methode aufgegeben.

Neuerdings hat Mohrmann einen äußerst einfachen und praktischen Apparat ersonnen und damit in Übereinstimmung mit mehreren Beobachtern günstige Resultate gewonnen. Durch sein gütiges Entgegenkommen war ich in der Lage, den Apparat zu meinen vergleichenden Untersuchungen mit heranzuziehen.

Unter dem Boden von zwei vertikal stehenden Glasröhren läßt sich eine Scheibe mit verschieden starken, schwarzen Quadraten verschieben, die durch einen Flachspiegel beleuchtet werden. In die eine Röhre kommt als Vergleichsobjekt die Standardaufschwemmung von bestimmtem Gehalt, in die andere der zu untersuchende Impfstoff. Dann sieht man von oben auf den Grund der Röhre und beurteilt, bei welcher Flüssigkeitshöhe beide Flüssigkeiten gleiche Durchsichtigkeit aufweisen. Der Standardvaccin ist so hergestellt, daß $1^{ccm} = 4^{mg}$ (2 Ösen) enthält, und wird, auf die Hälfte verdünnt, auf 5^{ccm} in die Röhre eingefüllt. Von dem zu prüfenden Impfstoff füllt man zunächst ebenfalls 5^{ccm} in die andere Röhre und nimmt dann soviel heraus bzw. füllt hinzu, bis beide Flüssigkeiten die gleiche Durchsichtigkeit aufweisen. Die Berechnung gestaltet sich dann folgendermaßen:

Ein Vaccin, der bei $2 \cdot 5^{ccm}$ Höhe gleiche Durchsichtigkeit aufwiese, wäre als 100 prozentig zu bezeichnen bei unverdünntem Standard, als 200prozentig bei verdünntem Standard. Genügt ein Impfstoff z. B. bei $3 \cdot 7^{cm}$ Höhe den Anforderungen, so haben wir nach der Gleichung

$$x = \frac{100 \cdot 2 \cdot 5}{3 \cdot 7} = 67 \cdot 5 \text{ Prozent.}$$

---

[1] *Handbuch.* 1908. Bd. I. S. 734.

Ich prüfte zunächst im Vergleich mit der Kammerzählung ein Reihe bereits fertiger Impfstoffe nach dieser Methode, deren Ergebnisse aus Tabelle III ersichtlich sind.

Tabelle III.

Datum des Impfstoffes	Keimzahl nach Kammerzählung in Mill. pro 1 ccm	Transparenz in Proz.
12. I. 15.	3207	69·4
13. I. 15.	3103	64
16. I. 15.	3129	67
18. I. 15.	3772	96
5. II. 15.	4083	92·5
20. II. 15.		
a)	3054	73·5
b)	3268	78
c)	3566	76
d)	3366	76
25. III 15.		
a)	3560	78
b)	3880	74
c)	4280	92·5
d)	4240	83
25. II. 15.		
a)	3120	62·5
b)	3480	71·5
c)	4120	89·2
12. II. 15.		
a)	3240	67
b)	3100	71
c)	3560	75·7
d)	3700	65·7

Stellt man diese Zahlen nach der Höhe der Keimzahlen zusammen, wie in Tabelle IV, so ergeben sich insofern gewisse Beziehungen, als die Keimzahlen von (=) 3000 bis 3800 einem Prozentgehalt von 64 bis 78 Prozent, die über 4000 einem solchen von 80 bis 90 Prozent entsprechen.

Die Methode erscheint demnach wohl brauchbar, um sich schätzungsweise zu vergewissern, ob ein Impfstoff wesentlich von den Durchschnittswerten abweicht. Dabei ist sie bequem und wenig zeitraubend.

Ob die Methode auch schärferen Anforderungen an Exaktheit entspricht, ist allerdings zweifelhaft. Es ist fraglich, ob die Transparenz lediglich durch die Keimzahl bedingt ist, und nicht auch durch Interzellularsubstanz oder durch eine gewisse Färbung der Kultur. Immerhin

Tabelle IV.

1	2443	72 Proz.	
2.	3054	73·5 „	
3	3100	71 „	
4	3103	64 „	
5	3120	62·5 „	
6	3129	67 „	
7	3207	69·4 „	
8	3240	67 „	
9	3268	78 „	64—78 Proz.
10	3366	76 „	
11	3480	71·5 „	
12	3560	75·7 „	
13	3560	78 „	
14	3566	76 „	
15	3700	65·7 „	
16	3772	96 „	
17	3880	74 „	
18	4083	92·5 „	
19	4220	89·2 „	80—90 Proz.
20	4240	83 „	
21	4280	92·5 „	

kommen nicht unerhebliche Abweichungen vor, wie z. B. Nr. 1, 14, 15, 16 zeigen. Auch etwaige Autolyse ist zu berücksichtigen.

In einer besonderen Versuchsreihe stellte ich selbst 10 Impfstoffe dadurch her, daß ich die Ernte von 1 Kolleschale bzw. 3 Petrischalen auf 100^{ccm} verteilte, im Wasserbad erhitzte, gut durchschüttelte und dann nebeneinander Transparenzbestimmung und Kammerzählung durchführte. Die Resultate waren folgende:

	Kolleschalen.				Petrischalen.		
	Trans-parenz	Keimzahl in Mill. pro 1 ccm	pro Öse		Trans-parenz	Keimzahl in Mill. pro 1 ccm	pro Öse
1	75·7	3700	1608	1	58·1	1880	1649
2	69·4	4080	1897	2	62·5	1800	1682
3	59	2400	1318	3	59	2320	1785
4	65·7	3340	1686	4	54·3	1680	1541
5	78	3680	2000	5	76	3360	1787

Auch hier sehen wir gute Übereinstimmung zwischen Keimzahl und Transparenz. Die 4 ersten Petrischalen waren aus unbekannten Ursachen abnorm schwach bewachsen. Dies kommt aber in den niedrigen Werten der Kammermethode und der Transparenzmethode gleichmäßig zum Ausdruck, und gerade daraus ist die Brauchbarkeit der beiden Prüfungsmethoden zu erkennen.

Ferner stellte ich mir selbst, teils von Kolleschalen-Kulturen, teils von 2 Petrischalen-Kulturen Standards dadurch her, daß ich 2 mg feuchte Kulturmasse in 1 ccm Kochsalslösung verteilte und diese mit dem von Mohrmann erhaltenen Testvaccin verglich. Es entsprachen 5 ccm des Standard Mohrmann von

Standard	1 (Petri)	4·3 ccm	= 116 Proz.	= 3600 Mill.	Keime	pro 1 ccm des unverdünnten Impfstoffes
„	2 „	3·4 ccm	= 147 „	= 5520 „	„	
„	3 (Kolle)	4·5 ccm	= 111 „	= 4480 „	„	
„	4 „	4.2 ccm	= 119 „	= 4560 „	„	

Offenbar weisen auch in diesen Versuchen die Kulturen verschiedener Schalen Schwankungen der Wachstumsintensität auf; dazu kommen geringe, unvermeidliche Ungenauigkeiten beim Wägen und Fehler durch Wasserverdunsten während des Wägens.

Daher werden Abweichungen in der Dichtigkeit solcher Standards unvermeidlich sein, und man wird besser die Kammerzählung den Standard-Impfstoffen zugrunde legen.

Herstellung der Schutzimpfstoffe.

Aus den vorstehenden Ausführungen ergibt sich, daß wir in der Kammerzählung eine genaue und in der Transparenzprüfung eine praktisch brauchbare, mit der Kammerzählung hinreichend übereinstimmende Methode besitzen, um die Dichtigkeit eines Impfstoffes zu prüfen.

An der Hand dieser Prüfungsmethoden sind wir nun auch in der Lage, die Frage zu entscheiden, ob die oben bereits betonte verschiedene Art der Anfertigung der Impfstoffe deren Dichtigkeit beeinflußt.

Die eine Methode besteht, wie oben ausgeführt wurde, darin, daß man ein Schrägagar-Röhrchen zu 10 Ösen, eine Petrischale zu 66, eine Kolleschale zu 200 Ösen rechnet und aus je 2 Ösen 1 ccm Aufschwemmung bereitet.

Abgesehen von der sehr ungenauen und hier nicht näher berücksichtigten Abschätzung nach Schrägagar-Röhrchen entspricht das angenommene Größenverhältnis der beiden Schalensorten keineswegs dem Augenmaß. Bestimmt man die Fläche von Kolle- und Petrischalen mittels Wägung entsprechender Papierstücke, so findet man für Petrischalen von 8·8 cm Durchmesser 60 qcm Fläche, für Kolleschalen 120 qcm; beide verhalten sich also wie 1:2. Die Fläche der Kolleschalen schwankt außerdem zwischen 117 und 126 qcm.

Trotzdem ergaben die nach der üblichen Rechnung hergestellten Impfstoffe bei der Kammerzählung gleichmäßige Resultate, die der Annahme eines Verhältnisses von 3 Petrischalen zu einer Kolleschale entsprachen (vgl. Tab. IV). Auch die Transparenzbestimmungen ergaben entsprechende Werte (64 bis 96 Prozent).

Die durchschnittliche Individuenzahl pro 1 Öse fiel etwas niedriger aus als nach der üblichen Annahme. Statt etwa 2000 Millionen Keimen betrug sie nach Tabelle I 1712 Millionen Keime pro Öse, 3423 pro 1 ccm, nach Tab. IV 3680 Millionen pro 1 ccm.

Das auffälligste ist aber, daß die Keimzahl so wenig der geschätzten und gemessenen Größe der Kulturfläche entsprach. Wenn eine Kolleschale nur eine zweimal so große Fläche enthält wie eine Petrischale, wenn sie aber dreimal so viel Keime liefert, so muß das Wachstum auf beiden Kulturflächen ungleich sein.

Dies muß sich dann auch in den Wägungsresultaten aussprechen, wenn man das zweite jetzt gebräuchliche Verfahren zur Bereitung der Schutzimpfstoffe benutzt, bei dem die feuchte Wägung der Kulturmasse die Grundlage für die Konzentration des Impfstoffes bildet. Nach Pfeiffer soll die ganze Kulturmasse jedesmal mit Hilfe eines Spatels ohne Beschädigung der Agaroberfläche abgestreift und das so gewonnene Material in einem sterilen Uhrschälchen gewogen werden; darauf wird die Masse in so viel physiologischer Kochsalzlösung, daß auf je 4 mg 1 ccm entfällt, gleichmäßig verrieben. Die Suspension soll möglichst homogen ausfallen, gröbere Partikel müssen durch Schütteln zerteilt werden. Dann erfolgt Abtötung im Wasserbad. — Da diese Methode von manchen als die zuverlässigere bzw. allein statthafte angesehen wird, mußte ich auch sie in meine vergleichenden Untersuchungen einbeziehen.

Für die feuchte Wägung ließ ich mir kleine Spatel aus versilbertem Aluminium herstellen, mit denen ich den Kulturrasen abstrich. Bei Kolleschalen wurde dazu der Deckel durch Sprengkohle abgehoben. Um den Einfluß des Wassergehaltes auf das Feuchtgewicht und das Verhältnis zwischen Feuchtigkeit und Kammerzählung zu ermitteln, wurde die Kulturmasse auf mehrere Stunden in den Trockenschrank von 100° gestellt und nach einigem Verweilen im Exsikkator gewogen. Ferner wurden nach der Wägung der feuchten Kultur zwei abgewogene Ösen zu je 2 mg in 1 ccm physiologische Kochsalzlösung verrieben, und mit dieser der Konzentration unseres Impfstoffs entsprechenden Aufschwemmung die Kammerzählung ausgeführt. Gelegentlich wurde auch noch eine dritte Öse zur Zählung der Kolonien mittels des Plattenzählverfahrens verwendet (s. oben).

Aus den in Tab. V und VI zusammengestellten Zahlen geht zunächst hervor, daß in der Tat in bezug auf Kulturmasse 3 Petrischalen einer Kolleschale entsprechen. Daß ferner auch die Ösenzahlen 187·3 und 61·4 mit den allgemein angenommenen Werten von 200 Ösen für eine Kolleschale und etwa 60 Ösen für eine Petrischale nahezu übereinstimmen. Die Keimzahlen, mittels Kammerzählung bestimmt, liegen für Kolleschalen und Petrischalen mit 3634 pro 1 ccm und 3383

pro 1 ccm sehr nahe, ebenso für die Ösen mit den Werten 1963 und 1872. Und bemerkenswerterweise stimmen sie auch hinreichend überein mit den Werten derjenigen Impfstoffe, die nach dem ersten Verfahren, nur unter Schätzung der Kulturflächen, hergestellt waren, nämlich 3423 Millionen pro 1 ccm, 1712 Millionen pro Öse.

Tabelle V.

Vergleichende Bestimmungen des Keimgehaltes mittels feuchter Wägung, Kammerzählung und Trockengewicht.

Kolleschalen.

	Feuchtgewicht in grm	Ösenzahl	Keimzahl in Mill. nach Kammerzählung pro Öse	pro 1 ccm	Trokkengewicht in mg	Wassergehalt in %	Trokkengehalt in %	Koloniezahl in Mill. pro Öse
1	0·2979	148·9	2250	3375	65	78·2	21·8	1883
2	0·3084	154·2	1850	2775	74·2	76	24	—
3	0·3680	184	2050	3690	94·3	75	25	—
4	0·3626	181·3	1350	2430	71·6	80·2	19·8	—
5	0·3244	162·2	1950	3120	75·8	77	23	1257
6	0·3693	184·6	2400	4320	75·6	75·6	24·4	1358
7	0·4235	211·7	1850	3885	95	77·6	22·4	—
8	0·4540	227	2100	4767	105·3	76·8	23·2	—
9	0·4652	232·6	1870	4346	105·4	77·2	22·8	—
Mittelwerte	0·3748	187·4	1963	3634	84·7	77·2	22·9	1499

Tabelle VI.

Vergleichende Bestimmungen des Keimgehaltes mittels feuchter Wägung, Kammerzählung und Trockengewicht.

Petrischalen.

	Feuchtgewicht in grm	Ösenzahl 3 Petrischalen	1 Petrischalen	Zahl d. Petrischalen auf 1 Kolleschale	Keimzahl nach Kammerzählung pro Öse	pro 1 ccm	Trokkengewicht in mg	Wassergehalt in %	Trokkengehalt in %	Koloniezahl in Mill. pro Öse
1	0·3832	191·6	64	2·3	1500	2850	87·4	77·2	22·8	1321
3	0·3271	163·3	54·4	3·4	1850	2960	78·9	75·9	24·1	—
5	0·3150	157·5	52·5	3·8	1820	2912	77·2	75·8	24·2	1257
6	0·3549	177·5	59·2	3·1	1845	3268	85·3	76	24	—
7	0·3453	172·6	57·5	3·7	1725	2984	82·4	76·2	23·8	—
8	0·4890	244·5	81·5	2·8	2180	5341	119·6	75·6	24·4	—
9	0·3624	181·2	60·4	3·8	1870	3366	87·9	75·8	24·2	—
Mittelwerte	0·3681	184	61·4	3·3	1872	3383	88·3	76	23·9	1289

Auch das Trockengewicht von 3 Petrischalen stimmt mit dem einer Kolleschale ziemlich überein. Wenn zuweilen, wie in Tab. V, 2, Keimzahl, Trockengewicht und Wassergehalt in keinem rechten Zusammenhang stehen, so ist daraus zu schließen, daß die Kultur besonders viel Interzellularsubstanz (wässerige Lösung von Nährstoffen, Stoffwechselprodukten usw.) enthielt. Der Wassergehalt des Bakterienrasens in Kolleschalen scheint im allgemeinen höher zu sein, was vielleicht mit der Art der Einfüllung des Nährbodens zusammenhängt. Kolleschalen werden sofort zur Sicherung der Sterilität nach Einfüllung des Agars mit dem Wattepfropfen verschlossen, so daß nur wenig Kondenswasser abdunsten kann, während Petrischalen meist erst längere Zeit offen gehalten werden. Kolleschalen enthalten daher meist auch mehr Kondenswasser.

Damit hängen vielleicht die entschieden günstigeren Wachstumsbedingungen für Cholerakulturen in Kolleschalen zusammen; denn es muß besonders betont werden, daß teilweise auch erhebliche höhere Werte der Kulturmasse für Kolleschalen erhalten wurden; so ermittelte ich in 2 Fällen etwa 260 Ösen, einmal 311 und einmal sogar 350 Ösen, während Tab. V nur eine Zahl von etwa 149 Ösen aufweist.

Aus welchen Gründen das Erntegewicht in einzelnen Fällen so großen Schwankungen unterworfen ist, läßt sich schwer sagen. Vielleicht spielen geringe Abweichungen vom Optimum des Nährbodens, verschieden hohe Schicht des Nährbodens, geringe Temperaturschwankungen des Brütschrankes durch zeitweises Öffnen während des Wachstums, die Zahl der übertragenen entwicklungsfähigen Keime beim Überimpfen eine ausschlaggebende Rolle. Jedenfalls handelt es sich hier um eine schon früher öfter beobachtete Erscheinung. Gotschlich und Weigang[1] fanden bei der Bestimmung der Gesamtindividuenzahl von 20stündigen Cholera-Kulturen bedeutende Schwankungen von 17640 bis 42840 Mill., und ebenso schwankte die Zahl der lebenden Keime pro Öse (s. S. 333). Sie führten diese Differenzen nur teilweise auf Versuchsfehler zurück und glaubten die Ursache darin gelegen, daß das Maximum der Entwicklung bei verschiedenen Kulturen geringe zeitliche Verschiebungen erfährt. Dieses Maximum scheint nach ihnen bei Kulturen mit 42 Mill. Keimen schon vor dem Alter von 20 Stunden, zwischen 12 und 20 Stunden zu liegen, so daß bei 20 Stunden schon der absteigende Schenkel der Wachstumskurve erreicht wird. Worin solche Verschiebungen begründet sein mögen, sei nicht in jedem Fall speziell anzugeben. Die Autoren verweisen auf geringe Differenzen im Wassergehalt des Nährbodens, geringe Schwankungen der

[1] *Zeitschrift für Hygiene u. Infektionskrankheiten.* Bd. XX. S. 386.

Temperatur des Thermostaten, wenn auch um weniger als 0·5°; die Dicke der Nährbodenschicht fanden sie von geringem Einfluß.

Jedenfalls regten die Wachstumsunterschiede, die Tab. VI, 8 auch bei Petrischalen einmal aufweist, sowie die Unterschiede in bezug auf Flächengröße und Kulturmasse zwischen Petrischalen und Kolleschalen zu Versuchen an, dies Verhältnis absichtlich zu beeinflussen und dadurch die Ursachen der Verschiedenheiten aufzudecken. Ich habe daher in einigen vorläufigen Versuchen mit den gleichen Methoden der feuchten Wägung, der Trockenwägung und der Kammerzählung die Wachstumsintensität von Cholerakulturen in Petrischalen unter verschiedenen Bedingungen geprüft. Eine Anzahl Petrischalen erhielten einen sehr großen Luftraum und viel Feuchtigkeit; während andere nur minimalen Luftgehalt zur Verfügung hatten, indem sie durch Plastulin abgedichtet wurden, so daß auch O-Zutritt unmöglich war, und Kondenswasser nicht abdunsten konnte. Die ersteren wurden offen in einer großen Schale auf angefeuchtetes Fließpapier gebracht, und eine hohe Glasglocke darüber gesetzt. Zur Kontrolle dienten normale Schalen. Die in Tab. VII angeführten Zahlen lieferten das bemerkenswerte Ergebnis, daß die Keimzahl mittels Kammerzählung in den abgedichteten Schalen am niedrigsten war, während das Gewicht der feuchten und trockenen Masse keine Abweichungen erkennen ließ. Da trotz der geringeren Keimzahl bei den abgedichteten Schalen das feuchte Gewicht unbeeinflußt war, so ist anzunehmen, daß die Kulturen neben Bakterienleibern mehr Interzellularsubstanz enthielten.

Tabelle VII.

Vergleichende Bestimmungen der Ernte unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.

	Feuchtgewicht in grm	Ösenzahl	Trockengewicht in mg	Wassergehalt in Proz.	Trockengehalt in Proz.	Kammerzählung. Zahl in Mill. pro Öse
1. Normale Petrischalen	0·122	61	28·2	76·9	23·1	1600
	0·1469	73·45	36	77·5	24·5	1580
	0·1325	66·25	32·6	75·4	24·6	2000
2. Schalen mit Abdichtung	0·2129	109·45	51·5	76·5	23·5	1040
	0·1540	72	39	74·7	25·3	1020
	0·1627	81·35	40·2	75·3	24·7	700
3. Schalen mit hohem Luftraume	0·1572	78·6	38·5	74·5	25·5	1800
	0·1447	72·3	35·2	75·7	24·3	1940
	0·2042	102·1	49·7	75·7	24·3	1980

Für die Praxis der Impfstoffbereitung ist es von Bedeutung, daß meine vergleichenden Untersuchungen keine Überlegenheit der Methode der Feuchtwägung über die Methode der Flächenabschätzung ergeben haben. Da letztere erheblich einfacher ist, wird man sie in Zukunft mit Recht vorzugsweise anwenden dürfen. — Wenn es Abweichungen des Nährbodens und der Züchtung gibt, welche die Individuenzahl pro Einheit der Kulturfläche erheblich verändern, so gibt es sicher auch solche, die das Verhältnis zwischen Erntegewicht und Individuenzahl verschieben. Nach beiden Seiten kann daher nur eine gewisse Sicherheit gegeben werden durch möglichste Gleichmäßigkeit der Kulturbedingungen. Dies geschieht aber bereits jetzt, bzw. kann fortan unschwer eingehalten werden. Gleiche Zusammensetzung des Agars, gleiche Schichthöhe, gleiche Kulturgefäße usw. sind bereits ziemlich allgemein eingeführt. Wird aber hierauf sorgfältig geachtet, dann gibt die Abschätzung der Fläche in der bisher üblichen Weise eine ungefähr ebenso gute Sicherheit für gleichmäßige Dichte, d. h. gleiche Individuenzahl in der Volumeinheit des fertigen Impfstoffs, wie die feuchte Wägung der Kulturmasse; und keinesfalls gibt letztere an sich bereits eine Garantie für eine bestimmte Konzentration des Impfstoffs.

Will man bei der Bereitung volle Sicherheit für die richtige Dichte eines Impfstoffes haben, dann gibt es nur ein Mittel: Bestimmung der Keimzahl mittels Kammerzählung in einer Probeaufschwemmung und danach Berechnung der erforderlichen Verdünnung.

Noch einen Punkt versuchte ich aufzuklären, der bei der Impfstoffbereitung oft zu Bedenken Anlaß gibt. Wenn größere Abfüllungen geliefert werden, so pflegt man ein ganzes Kulturgefäß in eine Flasche von

	a) Flaschen vom 20. II. 15.			b) Flaschen vom 25. III. 15.		
	Beob. A.	Beob. B	Diff.	Beob. A	Beob. B	Diff.
1	3240	2868	372	3100	2900	200
2	3072	2882	190	3966	4000	34
3	3128	3408	280	3240	3560	320
4	3132	2864	268	3200	3480	280
5	3208	2896	312	3670	3600	70
6	3364	3768	404	3416	3300	116
7	3600	3132	468			

gewünschtem Fassungsraum abzuschwemmen; z. B. je eine Kolleschale zu 200 Ösen in ein Fläschchen zu 100 ccm. Werden aber nur kleine Flaschen à 20 und 30 ccm abgefüllt, dann muß auch die Art des Abschwemmens bzw. Abfüllung geändert werden; es müssen eine Anzahl Kolleschalen in einem Literkolben abgeschwemmt und aus diesem die kleinen Flaschen in bereits fertiger Verdünnung gefüllt werden. Es erscheint von vornherein fraglich, ob hierbei ohne besondere Apparatur hinreichende Gleichmäßigkeit der Aufschwemmung erzielt werden kann. — Kammerzählungen solcher kleiner, nur nach gutem Durchschütteln der großen Kolben abgefüllter Flaschen ergaben mir nun vorstehende Werte.

Wir erhalten also ungefähr die gleiche Keimdichte und ebenso geringe Abweichungen der einzelnen Flaschen untereinander wie bei den großen Flaschen, so daß dieser Modus der Herstellung zu Bedenken keinen Anlaß gibt.

Die bisherigen Ergebnisse betreffen, wie ausdrücklich nochmals betont sei, nur die Cholera-Impfstoffe. Über das Verhalten einiger anderer, insbesondere der Typhusimpfstoffe, werde ich in Kürze berichten.

Lebenslauf.

Am 3. August 1884 wurde ich, Heinz Soltmann, in Ober-Schreiberhau in Schlesien, als Sohn des verstorbenen Geh. Med.-Rates Prof. Dr. Soltmann, geboren. Ich bin evangelischer Konfession. Nach bestandener Reifeprüfung, im März 1904 am Nicolai-Gymnasium zu Leipzig, besuchte ich die Universitäten Würzburg, München, Freiburg, Jena, Berlin. Im März 1907 bestand ich die ärztliche Vorprüfung in München. Bald darauf wurde ich durch Krankheit zu mehrjähriger Unterbrechung meines Studiums gezwungen. Im August 1914, nach Ausbruch des Krieges, bestand ich die ärztliche Notprüfung und wurde im September 1914 Assistent am königl. hyg. Institut zu Berlin. Im Oktober 1914 erhielt ich die Approbation als Arzt.